

507 106
Rec'd PCT/PTC 10 SEP 2004

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003年9月18日 (18.09.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/076626 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/29, 15/09, 9/02, A01H 1/00

(TSUKAYA,Yuichi) [JP/JP]; 〒444-0874 愛知県岡崎市竜美南2-4-1 竜美が丘公務員宿舎3-41 Aichi (JP). キム・キョンテ (KIM,Gyung-Tae) [KR/KR]; 604-714 釜山広域市砂下区下端2洞840番地 東亞大学校 生命資源科学部内 Pusan (KR).

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/02755

(22) 国際出願日: 2003年3月7日 (07.03.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(74) 代理人: 下田 昭, 外 (SHIMODA,Akira et al.); 〒160-0021 東京都新宿区歌舞伎町2-41-12 岡埜ビル7階 Tokyo (JP).

(26) 国際公開の言語: 日本語

(81) 指定国(国内): CN, US.

(30) 優先権データ:
特願2002-67063 2002年3月12日 (12.03.2002) JP
特願2002-248910 2002年8月28日 (28.08.2002) JP

(84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許 (CH, DE, FR, GB, NL).

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町4-1-8 Saitama (JP).

添付公開書類:
— 國際調査報告書
— 挿正書

(72) 発明者; および

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 塚谷 裕一



(54) Title: GENE PARTICIPATING IN THE SYNTHESIS OF BRASSINOSTEROID

(54) 発明の名称: ブラシノステロイド合成に関する遺伝子

(57) Abstract: Concerning brassinosteroid which is a plant hormone widely occurring in plants and showing physiological effects such as cell extension or cell division at an extremely low concentration, the most important synthase protein controlling the final step of its synthesis and the nucleic acid molecule encoding the same still remain unknown. An already known gene ROT3 (=CYP90C1, 51- to 1625-positions in SEQ ID NO:3, ACCESSION No. AB008097) is subjected to a homology research and thus a base sequence showing a 51% homology thereto is found out. As the results of examinations on this sequence, it is found out that this sequence is a novel gene (CYP90D1, SEQ ID NO:1) controlling the synthesis step of brassinosteroid having physiological effects of regulating plant size, etc. It is also found out that this gene CYP90D1 controls together with the above gene ROT3 (=CYP90C1) the final step of the synthesis of brassinosteroid.

WO 03/076626 A1

(57) 要約: ブラシノステロイドは、植物界に広く分布し、極低濃度で細胞伸張や細胞分裂などの生理作用を示す植物ホルモンであるが、その合成の最終的な合成ステップを司る最も重要な合成酵素蛋白質とそれをコードする核酸分子については不明であった。既に見出していた遺伝子ROT3 (=CYP90C1、配列番号3の51～1625位、ACCESSIONNo.AB008097)について相同性検索を行い、51%相同的な塩基配列を見出し、この配列を検討した結果、この配列が、植物体のサイズの制御など生理作用を有するブラシノステロイドの合成ステップを司る因子をコードする新規な遺伝子 (CYP90D1、配列番号1) であり、更に、発明者らは、この遺伝子CYP90D1が遺伝子ROT3 (=CYP90C1)と共同してブラシノステロイドの最終合成ステップを司っているということを見出した。

明細書

プラシノステロイド合成に関する遺伝子

5 技術分野

この発明は、プラシノステロイド合成に関する遺伝子に関し、より詳細には、遺伝子 ROT3 (= CYP90C1、配列番号3の51～1625位)と共同してプラシノステロイドの最終合成ステップを司る新規な遺伝子 (CYP90D1、配列番号1)に関する。

10

従来技術

プラシノステロイドは、植物界に広く分布し、極低濃度で細胞伸張や細胞分裂などの生理作用を示す植物ホルモンであり、40種以上の類縁体の総称である。

植物におけるプラシノステロイドの作用は極めて強く、さまざまな農業適応用の価値の高さが指摘され、関連特許も多数公開されている（例：特開平5-222090、特開平6-98648、特開平6-340689、特開平8-59408、特開平8-81310、特開平8-113503、特開平9-97など）。

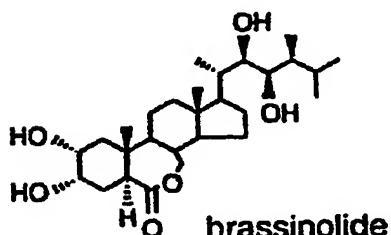
プラシノステロイドの生合成に関する研究も精力的に行われており、その合成経路についても解明が進んでおり（例えば、細胞工学別冊 植物細胞工学シリーズ10「植物ホルモンのシグナル伝達」p180-189 秀潤社（1998.8）藤岡ら「プラシノステロイドの生合成と情報伝達」）、プラシノステロイドの植物体内での合成系はシトクロム P450 型蛋白質が司ることが示されている。

発明者らは、既にシロイスナズナにおいて、シトクロム P450 ファミリーに属する ROTUNDIFOLIA3 (ROT3) 遺伝子を特定し (Gene & Development 25 12:2381-2391 (1998))、このROT3の発現を制御することにより葉や花の形状を変化させることができることを示した(Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol. 96, pp. 9433-9437 (1999))。

発明が解決しようとする課題

上記のように、プラシノステロイドの合成に関するシトクロム p450 型タンパク質をコードする核酸分子等が特定されているが（特表 2000-508524）、これまで知られていた合成系の核酸分子の働きは、プラシノステロイド合成系の比較的初期段階を司るものであったため、その作用を器官特異的にあるいは量的に調節できるような形で利用することは困難であった。更に、プラシノステロイドの合成の最終的な合成ステップを司る最も重要な合成酵素蛋白質とそれをコードする核酸分子については不明であった。ここで最終的ステップとは casteronone からプラシノイド (brassinolide、下記化学式) を合成するステップである（プラシノステロイドの全合成系については第 1 図に示す。）。

10



課題を解決するための手段と発明の実施の形態

本発明者らは、既に見出していた遺伝子 ROT3 (= CYP90C1、配列番号 3 の 5 1 ~ 1 6 2 5 位、ACCESSION No. AB008097) について相同性検索を行い、51%
15 相同の塩基配列を見出し、この配列を検討した結果、この配列が、植物体のサイズの制御など生理作用を有するプラシノステロイドの合成ステップを司る因子をコードする新規な遺伝子 (CYP90D1、配列番号 1) であることを見出した。更に、
20 発明者らは、この遺伝子 CYP90D1 が遺伝子 ROT3 (= CYP90C1) と共同してプラシノステロイドの最終合成ステップを司っているということを見出し、本発明を完成させるに至った。

本発明では、生理活性を実際に示すプラシノステロイド合成系を、これら ROT3 (= CYP90C1) 及び CYP90D1 により制御することを可能とする点で、従来法とは一線を画す。

即ち、単独の ROT3 (= CYP90C1) を植物体全体で発現させると葉及び花器官
25 でのみ効果を発揮し、しかも縦軸方向のみに効果を及ぼすことが判明している。

花器官とは葉が変形したものであり、遺伝子による形態制御の形態に共通性がある。

しかし、ROT3 (= CYP90C1) を CYP90D1 と組みあわせると、植物体全体に作用する。これら ROT3 (= CYP90C1) 及び CYP90D1 の核酸分子及びこのコードするタンパク質を人為的に操作することで、花や葉の形状を意図したとおりに同時に変形させることも、また植物体の背丈や葉の形状をほとんど変えることなく、花の形状のみを変えることもできる。

即ち、本発明は、(A) (1) 又は (2) の塩基配列から成る遺伝子である。

(1) 配列番号 1 の塩基配列

10 (2) 下記いずれかのタンパク質をコードする塩基配列

(a) 配列番号 2 のアミノ酸配列から成るタンパク質

(b) 配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、かつその発現によりプラシノステロイドの合成を促すタンパク質

15 本発明は更に、(B) (1) 又は (2) の塩基配列及び (3) 又は (4) の塩基配列を有するポリヌクレオチドである。

(1) 配列番号 1 の塩基配列

(2) 下記いずれかのタンパク質をコードする塩基配列

(a) 配列番号 2 のアミノ酸配列から成るタンパク質

20 (b) 配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、かつその発現によりプラシノステロイドの合成を促すタンパク質

(3) 配列番号 3 の 51～1625 位の塩基配列

(4) 下記いずれかのタンパク質をコードする塩基配列

25 (c) 配列番号 4 のアミノ酸配列から成るタンパク質

(d) 配列番号 4 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、かつその発現によりプラシノステロイドの合成を促すタンパク質

また本発明は、i) プロモーター及び上記 (A) の遺伝子を有し、該遺伝子が該

プロモーターに対して順方向に連結されているポリヌクレオチド、ii) プロモーター及び上記 (A) の遺伝子又はその部分配列を有し、該遺伝子又は該部分配列が該プロモーターに対して逆方向に連結されているポリヌクレオチド、iii) プロモーター及び上記 (B) のポリヌクレオチドを有し、該塩基配列のいずれもが該
5 プロモーターに対して順方向に連結されているポリヌクレオチド、又は iv) プロモーター及び上記 (B) のポリヌクレオチド又はそれらの部分配列を有し、該塩基配列の少なくとも一方又はそれらの部分配列の少なくとも一方が該プロモーターに対して逆方向に連結されているポリヌクレオチドである。

ここで用いるプロモーターとしては、詳細は後述するが、カリフラワーモザイクウィルスの 35S プロモーター・熱ショックプロモーター・化学物質誘導性プロモーター等が挙げられる。またプロモータ及び上記遺伝子の結合方法に特に制限は無く、通常の遺伝子工学的手法に従って適宜行うことができる。
10

更に本発明は、上記のいずれかの遺伝子又はポリヌクレオチドを含有するプラスミドであり、上記のいずれかの遺伝子又はポリヌクレオチドにより形質転換された植物である。
15

更に、本発明は、このポリヌクレオチドを含有するプラスミドである。ここで用いるプラスミドとして、T_i プラスミドの pBI-121 プラスミド等のバイナリーベクターが挙げられる。

また、本発明の適用できる植物は、種子植物全般である。
20 このような植物を形質転換するには、通常の遺伝子工学的手法を用いて、本発明の遺伝子を上記プラスミドに挿入し、上記植物を形質転換することができる。

また、本発明は、上記 (A) の遺伝子又は上記 (B) のポリヌクレオチドにより植物を形質転換し、該遺伝子又は該ポリヌクレオチドを発現させるか又はその発現を抑制することにより、該植物の形態を変化させる方法であり、更に、上記
25 のいずれかの遺伝子又はポリヌクレオチドにより形質転換された植物に前記プロモーターに応じた刺激を与えることにより、該植物の形態を変化させる方法であり、これらのいずれかの方法で形態が変化した植物である。

本発明は、また、以下 (a) 又は (b) のタンパク質である。

(a) 配列番号 2 のアミノ酸配列から成るタンパク質

(b) 配列番号2のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、かつその発現によりプラシノステロイドの合成を促すタンパク質

更に、本発明は、このタンパク質及び(c)又は(d)のタンパク質から成る
5 タンパク質の混合物又は複合物である。

(c) 配列番号4のアミノ酸配列から成るタンパク質

(d) 配列番号4のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、かつその発現によりプラシノステロイドの合成を促すタンパク質

10 CYP90D1 及び ROT3 (= CYP90C1) の核酸分子及びこれのコードするタンパク質は、以下のような操作により、人為的に操作することができる。

(1) 人為的に操作可能なプロモータに CYP90D1 (配列番号1) 及び ROT3 (= CYP90C1、配列番号3の51～1625位) の核酸分子を結合させたものを、適宜Tiプラスミド等の公知手段を用いて、植物に導入し、外的刺激をプロモータに与え、これら遺伝子の発現をコントロールする。ここで使用できるプロモーターの例として以下のものが挙げられる。

- 35S プロモータ (構成的に発現できる。)
- 熱ショックプロモータ (温度依存的に発現できる。)
- Dex 誘導性プロモータ (デキサメタゾンを投与することで発現をコントロールできる。)

20 ルできる。)
• ペチュニア CHS-A プロモータ (花弁の着色する性質の植物においては花弁特異的発現、シロイヌナズナなどでは花弁特異的発現をしないが、糖を投与することで茎葉で発現できる。)

等が挙げられるが、その他、植物の分野で公知の使用可能なプロモータを用いて
25 もよい。

(2) ROT3 あるいは CYP90D1 の機能を抑える方法：

アンチセンス RNA 法 (本来の向きと正反対に遺伝子領域を読むように改変した遺伝子を導入する方法) や RNAi 法 (遺伝子領域の一部を正逆タンデムにつないだものをつくり、これをまとめて読むように改変した遺伝子を導入する方法)

により、特定の遺伝子の機能を抑えることができる。本発明において、この方法により遺伝子発現を抑えることができる。いずれの場合も、標的となる遺伝子配列 (CYP90D1 (配列番号 1) 及び ROT3 (= CYP90C1、配列番号 3 の 51～1625 位)) が分かっているため、ねらい打ちができる。

5 (3) 組み合わせる方法：

古典遺伝学的に、それぞれ遺伝子 (CYP90D1 (配列番号 1) 及び ROT3 (= CYP90C1、配列番号 3 の 51～1625 位)) の改変株を作つておき、それらの間で掛け合わせによって作る方法と、直接遺伝子導入をまとめて行なう方法とが可能です。

10 (4) 前駆体発酵方法：

プラシノステロイド合成系のうち、これまで知られてきた遺伝子の少なくとも一部の遺伝子では、酵母菌で発現させたときに、実際に酵素活性を示した、という成功例がある。このような方法により、ROT3 及び CYP90D1 の組み合わせ、又はそれを酵母菌など真核細胞で発現させておいて、そこに前駆体を与えることでカスタステロンあるいはプラシノライド (最終産物で、かつ活性物質) を人工合成する。

図面の簡単な説明

第 1 図は、プラシノステロイドの全合成系を示す。

20 第 2 図は、シロイズナズナの野生株 (W s - 2) (No. 1)、製造例 1 の株 (ROT3 の機能抑制) (No. 2)、及び製造例 2 で作製した株 (ROT3 及び CYP90D1 の機能抑制) (No. 3 及び 4) を同条件で栽培した葉の形状を示す。No. 3 は効果がやや弱い株、No. 4 は効果が強く出た株である。

25 第 3 図は、ROT3 及び CYO90D1 の機能不全の株にプラシノステロイド合成系中間体及びプラシノライドを投与した後の葉の形状を示す。Control : 何も投与しない、6-D-CT : 6-Deoxocathasterone を投与 (以下同じ。)、6-D-TE : 6-Deoxoteasterone、6-D-3DT : 3-Dehydro-6-deoxoteasterone、6-D-TY : 6-Deoxotyphasterol、6-D-CS : 6-Deoxocastasterone、CT : Cathasterone、TE : Teasterone、3DT :

3-Dehydroteasterone、T Y : Typhasterol、C S : Castasterone、B L :
Brassinolide

発明の効果

5 従来の、植物に顕著な生理作用を有するステロイド化合物の合成ステップ制御に関する発明は、いくつか実用面で問題点を有していた。

即ち、従来解明されていたプラシノステロイド合成系の制御因子は、合成系の早期ステップに関するものであったため、例えばその合成系をトランスジェニック植物において強発現させると、植物体全体が徒長し、大型化する。これは特殊
10 な用途以外には、実際には利用価値がなかった。逆にその合成系をトランスジェニク植物系を使ってストップさせると、植物体全体が著しく小型化し、これも特殊な用途以外には、実際には利用価値がなかった。即ち、従来法によって植物体全体が変化してしまうこと、しかもその変化が価値の低いものであることが問題である。実際に応用的に利用価値のあるトランスジェニック植物とは、例えば
15 花卉園芸上では花だけが大きい、あるいは葉のみが小さいものであり、蔬菜改良についていえば、葉のみが大きい、といったものである。そのためには、従来法に関しては、特殊な発現調節システム等を組み合わせないかぎり解決が困難であった。しかし、本発明の示すように、ROT3 (= CYP90C1) と CYP90D1 を共同して用いることにより、特定の器官のみ特定の方向（特に、縦方向）へのサイズの
20 制御や植物体全体のサイズの制御も可能になった。

また、本発明において、ROT3 (= CYP90C1) 及び CYP90D1 が共同して最終ステップを支配していることを解明した。そのため、プラシノステロイドの化学合成系として利用した様々な工業的利用が可能になる。

25 以下、実施例により本発明を例証するが、これらは本発明を制限することを意図したものではない。

製造例 1

ROT3 の機能抑制には、ROT3 遺伝子の機能欠損型変異体 rot3-1 (Tsuge et al.

Development 122: 1589-1600 (1996) に報告した株) を用いた。これを常法により無菌は種の後、23 度恒温条件で培養した。

製造例 2

5 一方、ROT3 及び CYP90D1 の両方の機能抑制には、まず ROT3homolog (CYP90D1) を特異的に増幅するプライマーセット
ROT3h-cDNA-for: 5'-GTTAAAACACTAATGGACAC-3' (配列番号 5)
ROT3h-cDNA-rev: 5'-TGATTATATTCTTTGATCC-3' (配列番号 6)
により CYP90D1 の cDNA (配列番号 1) をシロイヌナズナから単離した。一方、
10 汎用ベクター pBI121 にハイグロマイシン耐性遺伝子を選択マーカーを加え、更にその中の GUS タンパクコード領域を取り除き、そこに前述の CYP90D1 (配列番号 1) のクローンを、本来と逆向きに Cauliflower mosaic Virus 35S プロモーターで読まれるように組み込んだ。これをアグロバクター (C58C1 Rif-resistant) に導入し、常法に従い培養懸濁液を用いて、in planta 法により
15 シロイヌナズナ rot3-1 変異体に導入した。その形質転換体をハイグロマイシンで選抜の上、自家受粉により導入遺伝子がホモに入っている個体を作出した。常法により無菌は種の後、23 度恒温条件で培養した。

実施例 1

20 シロイヌナズナの野生株 (Ws - 2)、製造例 1 の株 (ROT3 の機能抑制) 及び 製造例 2 で作製した株 (ROT3 及び CYP90D1 の機能抑制) を同条件で栽培した葉の形状を第 2 図に示す。

ROT3 (第 2 図-2) の機能抑制したものは、野生株 (第 2 図-1) と比べ葉が 縦方向にのみ縮まっているのに対し、ROT3 及び CYP90D1 の両方の機能抑制した 25 もの (第 2 図-3 及び 4) は、これらに比べ顕著に葉が縮まっている。即ち、ROT3 と CYP90D1 とは共同してプラシノステロイドの合成を司る遺伝子であることが 分かる。

実施例 2

製造例2で作製したROT3及びCYO90D1の機能不全の株を、種子から無菌培養した。培地は2% (w/v) のスクロース入りMS培地(0.2% ゲルライトで固化)を使い、常法により無菌は種の後、23度恒温条件で培養した。

一方、プラシノステロイド合成系中間体(6-D-C T : 6-
5 Deoxocathasterone, 6-D-T E : 6-Deoxoteasterone, 6-D-3 D T :
3-Dehydro-6-deoxoteasterone, 6-D-T Y : 6-Deoxotyphasterol,
6-D-C S : 6-Deoxocastasterone, C T : Cathasterone, T E :
Teasterone, 3 D T : 3-Dehydroteasterone, T Y : Typhasterol, C S :
Castasterone)及びプラシノライド(B L)(B Lは和光純薬より購入(富士
10 化学工業製)、他のプラシノステロイドは理研・藤岡昭三博士及び上越教育
大・高津戸秀博士より分与された。)のそれぞれの水溶液(濃度0.1 μM/1)
を用意した。

これらの水溶液に上記植物(ROT3及びCYO90D1の機能不全の株)が水没する
ようにして、ゆっくりと振盪培養した。葉柄の処理の場合は、植物を無菌的に取
15 り出し、メスにより葉柄を切り出して、同様の処理を行った。それらの葉の写真
を第3図に示す。

第3図より、ROT3及びCYO90D1の両遺伝子の機能欠失体に対し、プラシノス
テロイド各誘導中間体は効果を示さないが、最終生産物であるプラシノライド(B
L)を与えたものは葉が大きく、顕著な効果を示した。即ち、プラシノステロイ
20 ドの合成ステップの最終生成物であるプラシノライドの合成をROT3とCYP90D1
とが共同で支配していることがわかる。

実施例3

シロイヌナズナの野生株(Ws-2)、製造例1で作製した株(ROT3の機能抑
制、rot3-1とrot3-5)及び製造例3で作製した株(ROT3及びCYP90D1の機
25 能抑制、rot3/CYP90D1)における各プラシノステロイドの量を測定した。この
量は、植物体のロゼット時期に地上部を刈り取り、凍結乾燥の後、HPLC及び
GC-MSを用いて測定した。その結果を表1に示す。

表1

| | ng/g | | | |
|---------------------|------|--------|--------|--------------|
| | Ws-2 | rot3-1 | rot3-5 | rot3/CYP90D1 |
| 6-Deoxoteasterone | 0.05 | 0.19 | 0.11 | 0.26 |
| 3-Deoxotyphasterol | 2.30 | 3.49 | 4.30 | 0.38 |
| 6-Deoxocastasterone | 2.60 | 1.88 | 4.00 | 0.034 |
| Teasterone | — | 0.004 | 0.02 | — |
| Typhasterol | 0.27 | 0.38 | 0.46 | 0.014 |
| Castasterone | 0.28 | 0.31 | 0.50 | 0.020 |
| Brassinolide | 0.20 | 0.04 | 0.06 | — |

注：表中（一）で示したところは、測定限界(0.001ng/g)以下であったことを示す。

ROT3 を抑制したものは (rot3-1 及び rot3-5)、プラシノライドの生成を顕著に抑制し、その結果それ以前のプラシノステロイド（特に、Castasterone）の生成量が上昇していることがわかる。しかし、ROT3 の抑制によりプラシノライドの生成を完全に止めるに至っていない。即ち、rot3 はそれのみではプラシノライドの生成を完全に制御しているわけではないことも同時に示されている。

一方、ROT3 及び CYP90D1 の機能抑制したものについては、プラシノステロイドの合成系のなかでプラシノライド (brassinolide) の量が極端に減少しており、ROT3 及び CYP90D1 の両者の機能を抑制すると、castasterone からプラシノライド (brassinolide) への合成が完全に抑制されることがわかる。即ち、ROT3 と CYP90D1 とが共存することによって初めてプラシノライドの生成を完全に制御していることが示されている。

請求の範囲

1. (1) 又は (2) の塩基配列から成る遺伝子。
 - (1) 配列番号 1 の塩基配列
- 5 (2) 下記いずれかのタンパク質をコードする塩基配列
 - (a) 配列番号 2 のアミノ酸配列から成るタンパク質
 - (b) 配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、かつその発現によりプラシノステロイドの合成を促すタンパク質
- 10 2. (1) 又は (2) の塩基配列及び (3) 又は (4) の塩基配列を有するポリヌクレオチド。
 - (1) 配列番号 1 の塩基配列
 - (2) 下記いずれかのタンパク質をコードする塩基配列
 - (a) 配列番号 2 のアミノ酸配列から成るタンパク質
 - (b) 配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、かつその発現によりプラシノステロイドの合成を促すタンパク質
 - (3) 配列番号 3 の 51 ~ 1625 位の塩基配列
 - (4) 下記いずれかのタンパク質をコードする塩基配列
- 15 20 (c) 配列番号 4 のアミノ酸配列から成るタンパク質
 - (d) 配列番号 4 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、かつその発現によりプラシノステロイドの合成を促すタンパク質
3. プロモーター及び請求項 1 に記載の遺伝子を有し、該遺伝子が該プロモーターに対して順方向に連結されているポリヌクレオチド。
- 25 4. プロモーター及び請求項 1 に記載の遺伝子又はその部分配列を有し、該遺伝子又は該部分配列が該プロモーターに対して逆方向に連結されているポリヌクレオチド。
5. プロモーター及び請求項 2 に記載のポリヌクレオチドを有し、該塩基配列

のいずれもが該プロモーターに対して順方向に連結されているポリヌクレオチド。

6. プロモーター及び請求項 2 に記載のポリヌクレオチド又はそれらの部分配列を有し、該塩基配列の少なくとも一方又はそれらの部分配列の少なくとも一方が該プロモーターに対して逆方向に連結されているポリヌクレオチド。

5 7. 請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の遺伝子又はポリヌクレオチドを含有するプラスミド。

8. 請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の遺伝子又はポリヌクレオチドにより形質転換された植物。

9. 請求項 1 に記載の遺伝子又は請求項 2 に記載のポリヌクレオチドにより植物を形質転換し、該遺伝子又は該ポリヌクレオチドを発現させるか又はその発現を抑制することにより、該植物の形態を変化させる方法。

10 10. 請求項 3 ~ 6 のいずれか一項に記載の遺伝子又はポリヌクレオチドにより形質転換された植物に前記プロモーターに応じた刺激を与えることにより、該植物の形態を変化させる方法。

15 11. 請求項 9 又は 10 に記載の方法で形態が変化した植物。

12. 以下 (a) 又は (b) のタンパク質。

(a) 配列番号 2 のアミノ酸配列から成るタンパク質

(b) 配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、かつその発現によりプラシノステ

20 ロイドの合成を促すタンパク質

13. 請求項 12 に記載のタンパク質及び (c) 又は (d) のタンパク質から成るタンパク質の混合物又は複合物。

(c) 配列番号 4 のアミノ酸配列から成るタンパク質

(d) 配列番号 4 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、かつその発現によりプラシノステ

25 ロイドの合成を促すタンパク質

補正書の請求の範囲

補正書の請求の範囲 [2003年6月10日(10. 06. 03)国際事務局受理：出願
当初の請求の範囲7—10及び13は補正された；出願当初の請求の範囲1, 3, 4及び
12は取り下げられた；他の請求の範囲は変更なし。(2頁)]

1. (削除)
2. (1) 又は(2)の塩基配列及び(3)又は(4)の塩基配列を有するポリヌクレオチド。
 - (1) 配列番号1の塩基配列
 - (2) 下記いずれかのタンパク質をコードする塩基配列
 - (a) 配列番号2のアミノ酸配列から成るタンパク質
 - (b) 配列番号2のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、かつその発現によりプラシノステロイドの合成を促すタンパク質
 - (3) 配列番号3の51～1625位の塩基配列
 - (4) 下記いずれかのタンパク質をコードする塩基配列
 - (c) 配列番号4のアミノ酸配列から成るタンパク質
 - (d) 配列番号4のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、かつその発現によりプラシノステロイドの合成を促すタンパク質
3. (削除)
4. (削除)
5. プロモーター及び請求項2に記載のポリヌクレオチドを有し、該塩基配列のいずれもが該プロモーターに対して順方向に連結されているポリヌクレオチド。
6. プロモーター及び請求項2に記載のポリヌクレオチド又はそれらの部分配列を有し、該塩基配列の少なくとも一方又はそれらの部分配列の少なくとも一方が該プロモーターに対して逆方向に連結されているポリヌクレオチド。
7. (補正後) 請求項2、5又は6に記載の遺伝子又はポリヌクレオチドを含有するプラスミド。
8. (補正後) 請求項2、5又は6に記載の遺伝子又はポリヌクレオチドにより形質転換された植物。
9. (補正後) 請求項2に記載のポリヌクレオチドにより植物を形質転換し、該

遺伝子又は該ポリヌクレオチドを発現させるか又はその発現を抑制することにより、該植物の形態を変化させる方法。

10. (補正後) 請求項 5 又は 6 に記載の遺伝子又はポリヌクレオチドにより形質転換された植物に前記プロモーターに応じた刺激を与えることにより、該植物
5 の形態を変化させる方法。

11. 請求項 9 又は 10 に記載の方法で形態が変化した植物。

12. (削除)

13. (補正後) (a) 又は (b) のタンパク質及び (c) 又は (d) のタンパク質から成るタンパク質の混合物又は複合物。

10 (a) 配列番号 2 のアミノ酸配列から成るタンパク質

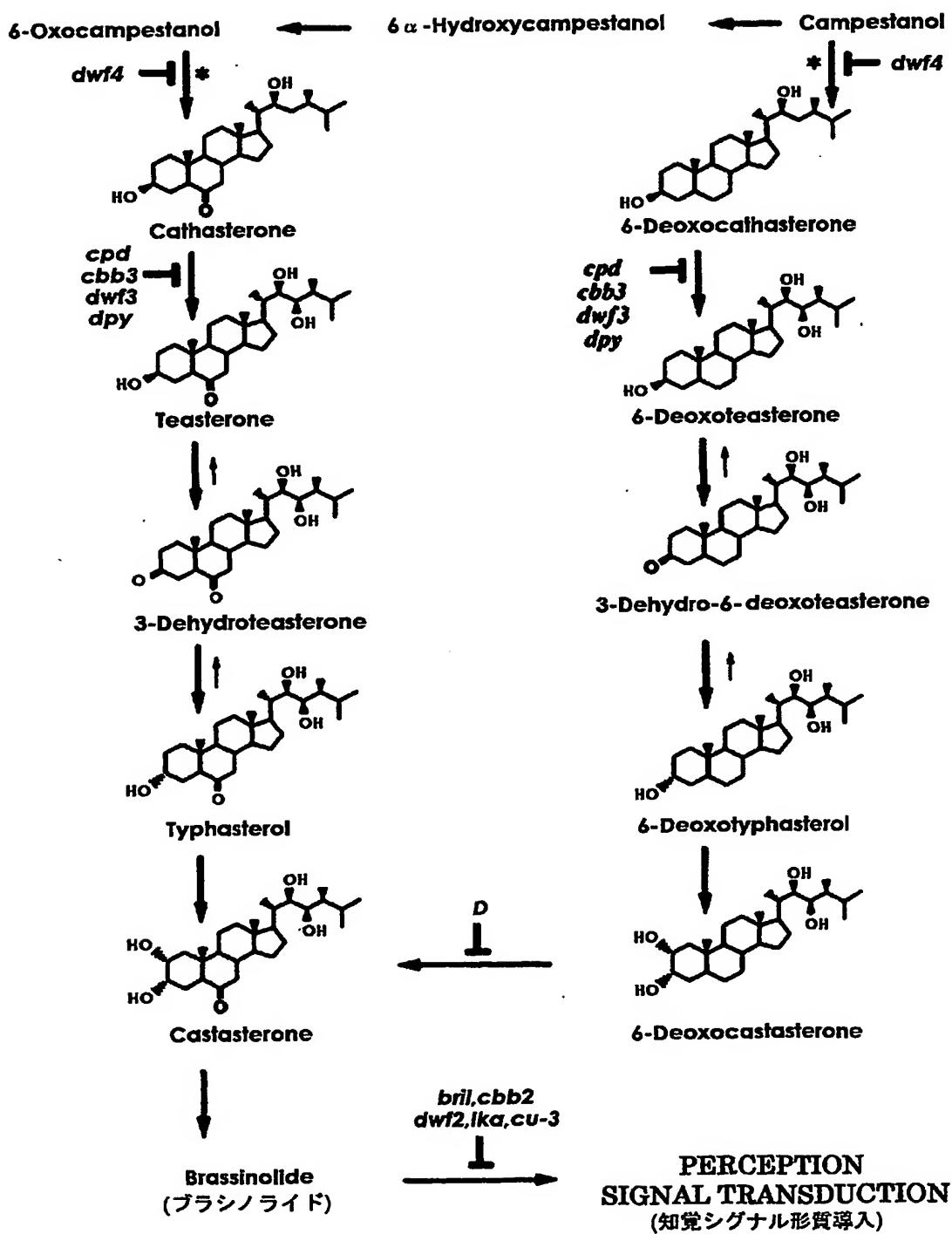
(b) 配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、かつその発現によりプラシノステロイドの合成を促すタンパク質

(c) 配列番号 4 のアミノ酸配列から成るタンパク質

15 (d) 配列番号 4 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、かつその発現によりプラシノステロイドの合成を促すタンパク質

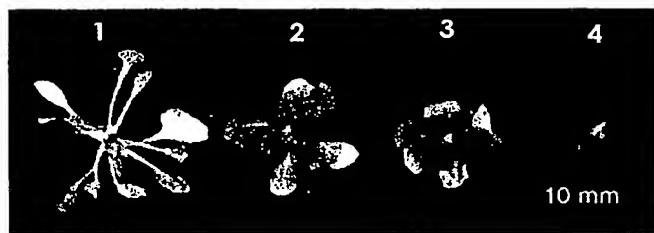
1/2

第1図

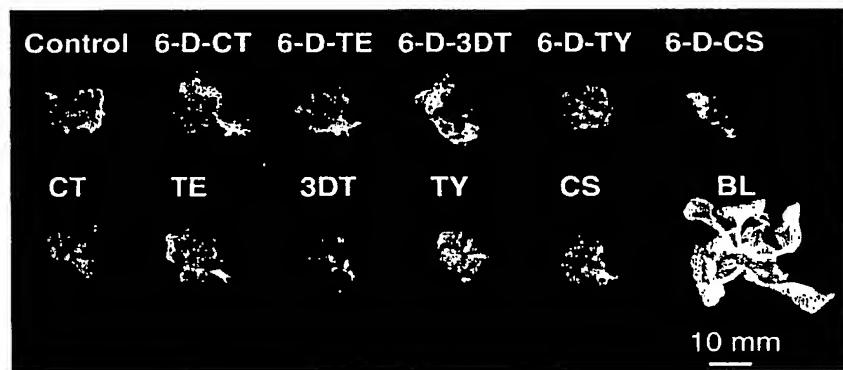


2/2

第 2 図



第 3 図



SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> プラシノステロイド合成に関する遺伝子

<130> FS03-311PCT

<160> 6

<210> 1

<211> 1473

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

| | |
|--|------|
| atggacactt cttcttcact tttgttcttc tccttcttct tctttatcat catcgcatc | 60 |
| ttcaacaaga tcaacggtct cagatcatcc ccagcttcaa agaaaaaaact taatgatcat | 120 |
| catgttacat cccagagtca cggaccaaag ttccacacg gaagcttggg atggccgc | 180 |
| atcggtgaaa ccatcgagtt cgtctttct gcttactcag accgtcttga gagtttcatg | 240 |
| gacaaggcgtc gtctcatgtt tgggagagtg tttaagtgcg atattttgg aacggcgacg | 300 |
| atcggtcgaa cggatgctga agtgaacaga gcccgtttac agagcgactc gacagcttc | 360 |
| gtgccgtttt acccaaaaac ggtaagggag ctaatggaa aatcgctgat acttcttata | 420 |
| aacgggagtt tacatagacg gttccatgga ttagtcggtt ct当地ttaaaa gtcgccactt | 480 |
| ctcaaagctc aaatcgtagt agacatgcac aagttttgt cgaaatccat ggatctatgg | 540 |
| tccgaggacc aacctgtgct cctccaagac gtctccaaga ctgttgattt caaagtactt | 600 |
| gccaaggcat tgataagtgt agagaaagga gaagatttg aagagctaaa gagagagttt | 660 |
| gaaaatttca tatcaggact catgtcatta ccaattaact tccctggAAC gcaactccat | 720 |
| agatctctcc aagctaagaa gaatatggtg aagcaatttg aaagaatcat agaaggcaaa | 780 |
| attaggaaaa caaagaacaa ggaggaagat gatgttattt caaaggatgt tgtggatgt | 840 |
| ttgcttaagg actcaagtga acatttaact cacaatttga ttgcttaacaa tatgatcgac | 900 |
| atgatgatcc ctggccacga ttctgtccct gtctcatta ccctggcgt caaattcctc | 960 |
| tctgattctc ctgctgccct caatctctta acgaaaaaca tgaagctgaa aagtttgaag | 1020 |
| gaattgacag gagagccact atattggaaat gactacttgt cgtaacctt aacacaaaaag | 1080 |
| gtgattacag agacactgag aatggaaat gttataattt gagtgtatgag aaaggcgatg | 1140 |

2/8

aaagatgttg aaataaaaagg atatgtata cccaaaggat ggtgttctt ggcctatctc 1200
 agatcagttc atcttgatga agcttattat gagtctccgt acaaatttaa tccctggaga 1260
 tggcaagaaa gggacatgaa cacgagtagt ttcagtcctt ttggaggtgg tcagagattg 1320
 tgccctggtc tcgatttggc tcgtcttgaa acttcagttt ttcttcacca tcttgtcact 1380
 cgcttcagat ggatagcaga agaagacaca atcataaact tcccaacggt gcatatgaag 1440
 aacaaattac ccatttggat caaaagaata taa 1473

<210> 2

<211> 490

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 2

Met Asp Thr Ser Ser Ser Leu Leu Phe Phe Ser Phe Phe Phe Ile

1 5 10 15

Ile Ile Val Ile Phe Asn Lys Ile Asn Gly Leu Arg Ser Ser Pro Ala

20 25 30

Ser Lys Lys Lys Leu Asn Asp His His Val Thr Ser Gln Ser His Gly

35 40 45

Pro Lys Phe Pro His Gly Ser Leu Gly Trp Pro Val Ile Gly Glu Thr

50 55 60

Ile Glu Phe Val Ser Ser Ala Tyr Ser Asp Arg Pro Glu Ser Phe Met

65 70 75 80

Asp Lys Arg Arg Leu Met Tyr Gly Arg Val Phe Lys Ser His Ile Phe

85 90 95

Gly Thr Ala Thr Ile Val Ser Thr Asp Ala Glu Val Asn Arg Ala Val

100 105 110

Leu Gln Ser Asp Ser Thr Ala Phe Val Pro Phe Tyr Pro Lys Thr Val

115 120 125

Arg Glu Leu Met Gly Lys Ser Ser Ile Leu Leu Ile Asn Gly Ser Leu

130 135 140

3/8

His Arg Arg Phe His Gly Leu Val Gly Ser Phe Leu Lys Ser Pro Leu
145 150 155 160
Leu Lys Ala Gln Ile Val Arg Asp Met His Lys Phe Leu Ser Glu Ser
165 170 175
Met Asp Leu Trp Ser Glu Asp Gln Pro Val Leu Leu Gln Asp Val Ser
180 185 190
Lys Thr Val Ala Phe Lys Val Leu Ala Lys Ala Leu Ile Ser Val Glu
195 200 205
Lys Gly Glu Asp Leu Glu Leu Lys Arg Glu Phe Glu Asn Phe Ile
210 215 220
Ser Gly Leu Met Ser Leu Pro Ile Asn Phe Pro Gly Thr Gln Leu His
225 230 235 240
Arg Ser Leu Gln Ala Lys Lys Asn Met Val Lys Gln Val Glu Arg Ile
245 250 255
Ile Glu Gly Lys Ile Arg Lys Thr Lys Asn Lys Glu Glu Asp Asp Val
260 265 270
Ile Ala Lys Asp Val Val Asp Val Leu Leu Lys Asp Ser Ser Glu His
275 280 285
Leu Thr His Asn Leu Ile Ala Asn Asn Met Ile Asp Met Met Ile Pro
290 295 300
Gly His Asp Ser Val Pro Val Leu Ile Thr Leu Ala Val Lys Phe Leu
305 310 315 320
Ser Asp Ser Pro Ala Ala Leu Asn Leu Leu Thr Lys Asn Met Lys Leu
325 330 335
Lys Ser Leu Lys Glu Leu Thr Gly Glu Pro Leu Tyr Trp Asn Asp Tyr
340 345 350
Leu Ser Leu Pro Leu Thr Gln Lys Val Ile Thr Glu Thr Leu Arg Met
355 360 365
Gly Asn Val Ile Ile Gly Val Met Arg Lys Ala Met Lys Asp Val Glu

4/8

| | | |
|---|-----|-----|
| 370 | 375 | 380 |
| Ile Lys Gly Tyr Val Ile Pro Lys Gly Trp Cys Phe Leu Ala Tyr Leu | | |
| 385 | 390 | 395 |
| Arg Ser Val His Leu Asp Glu Ala Tyr Tyr Glu Ser Pro Tyr Lys Phe | | |
| 405 | 410 | 415 |
| Asn Pro Trp Arg Trp Gln Glu Arg Asp Met Asn Thr Ser Ser Phe Ser | | |
| 420 | 425 | 430 |
| Pro Phe Gly Gly Gln Arg Leu Cys Pro Gly Leu Asp Leu Ala Arg | | |
| 435 | 440 | 445 |
| Leu Glu Thr Ser Val Phe Leu His His Leu Val Thr Arg Phe Arg Trp | | |
| 450 | 455 | 460 |
| Ile Ala Glu Glu Asp Thr Ile Ile Asn Phe Pro Thr Val His Met Lys | | |
| 465 | 470 | 475 |
| Asn Lys Leu Pro Ile Trp Ile Lys Arg Ile | | |
| 485 | 490 | |

<210> 3

<211> 1934

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 3

| | |
|---|-----|
| tgtgcttagg catatagtta ttcccaagaa accggtttaa ctgtttacgt atgcaacctc | 60 |
| cggcaaggcgc aggacttttc cggtcgccgg aaaatctccc ttggccttat aattacatgg | 120 |
| attatttttgtt cgctggtttc ttggtttgaa cggccggaat acttctccgt ccatggctct | 180 |
| ggtttcgtct acgaaaactcg aaaacgaaag atggagatga agaagaagat aatgaggaga | 240 |
| agaagaaggg aatgattcca aacggaagct taggctggcc ggtgatcgga gaaaccctaa | 300 |
| acttcatcgc ttgtggttat tcttctcgcc ctgttacctt catggacaaa cgaaagtctt | 360 |
| tatacgggaa agtgttcaaa acgaacataa tagggacacc aatcataata tcaaccgatg | 420 |
| cagaggtgaa taaagtggtg ctccaaaacc atggaaacac atttgtccct gcatacccta | 480 |
| aatcaattac ggaactactt ggagaaaact ctattctcag catcaatgga cctcatcaa | 540 |

5/8

| | |
|---|------|
| aaaggcttca cacgctcatt ggccgcgttcc tcagatctcc tcacctcaaa gaccggatca | 600 |
| ctcgagacat tgaggcctcg gttgttctca ctttggcgtc ttgggctcaa cttccattgg | 660 |
| ttcatgttca ggatgagatc aaaaagatga cgtttgagat attagtaaaa gtgttcatgtga | 720 |
| gcacatctcc tggtaagat atgaacattc tcaaacttga gttcgaagaa ttcatcaaag | 780 |
| gtttgatttgc tatcccaatc aaattccctg gcactagact ctacaaatcc ttaaaggcga | 840 |
| aagagaggtt aataaagatg gtaaaaaagg ttgtggagga gagacaagtgc gcgtatgacaa | 900 |
| cgacgtctcc ggcaaatgac gtgggtggacg tacttctaag agacggtggt gattcagaga | 960 |
| agcaatctca accgtcagat ttctgtcagcg gaaagatcgt agagatgtatccggag | 1020 |
| aggaaacaat gccaacggcg atgaccttgg ctgtcaaattt cttaagtgc aacccgtcg | 1080 |
| ctcttagccaa actcgtggag gagaatatgg agatgaagag gcgtaaattt gaattggag | 1140 |
| aagaatacaa gtggaccgat tatatgtctc tctcttttac tcaaaatgtg ataaacgaaa | 1200 |
| cgcttagaat ggctaacatt attaacgggg tgtggaggaa agctctcaag gatgtagaaa | 1260 |
| ttaaaggta cttaataccg aaaggatggt gtgtatttgc atcattcata tcggttcaca | 1320 |
| tggatgaaga catttatgtat aatccctatc aattcgatcc gtggagatgg gacagaatta | 1380 |
| atggatcggc aaacagcagt atttgcgtca cacccttgg tggggcaaa aggctatgtc | 1440 |
| ctggtttaga gctgtcgaag ctcgaaatat ccatttttct tcaccacctt gtaacccgg | 1500 |
| acagttggac ggctgaggaa gacgagatag tgtcatttcc gactgtgaag atgaagcgg | 1560 |
| ggctcccgat ccgagtggct actgttagatg atagtgcctc tccgatctca cttgaagatc | 1620 |
| attaatagat catttcaaag aacaaaactg tttgtgcaaa gaggaagcag agaagtaaac | 1680 |
| aaatgtatctt attaacaat agtagagaag agaagcaaac aagattggtg ggttagacag | 1740 |
| aaagaacnaa acgtacagct agtgtatggct caaagatgag agattctaattataatttt | 1800 |
| tttgggttgc atgtcaaattt ataagcggtt gtttaggttgt ccctttctt tttattttatc | 1860 |
| gtacccaaacg caagttgaga tatgattcca tatatatggatgatgtatgtatattat | 1920 |
| atatacgccgc cggg | 1934 |

<210> 4

<211> 524

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 4

6/8

Met Gln Pro Pro Ala Ser Ala Gly Leu Phe Arg Ser Pro Glu Asn Leu
1 5 10 15
Pro Trp Pro Tyr Asn Tyr Met Asp Tyr Leu Val Ala Gly Phe Leu Val
20 25 30
Leu Thr Ala Gly Ile Leu Leu Arg Pro Trp Leu Trp Phe Arg Leu Arg
35 40 45
Asn Ser Lys Thr Lys Asp Gly Asp Glu Glu Asn Glu Glu Lys
50 55 60
Lys Lys Gly Met Ile Pro Asn Gly Ser Leu Gly Trp Pro Val Ile Gly
65 70 75 80
Glu Thr Leu Asn Phe Ile Ala Cys Gly Tyr Ser Ser Arg Pro Val Thr
85 90 95
Phe Met Asp Lys Arg Lys Ser Leu Tyr Gly Lys Val Phe Lys Thr Asn
100 105 110
Ile Ile Gly Thr Pro Ile Ile Ser Thr Asp Ala Glu Val Asn Lys
115 120 125
Val Val Leu Gln Asn His Gly Asn Thr Phe Val Pro Ala Tyr Pro Lys
130 135 140
Ser Ile Thr Glu Leu Leu Gly Glu Asn Ser Ile Leu Ser Ile Asn Gly
145 150 155 160
Pro His Gln Lys Arg Leu His Thr Leu Ile Gly Ala Phe Leu Arg Ser
165 170 175
Pro His Leu Lys Asp Arg Ile Thr Arg Asp Ile Glu Ala Ser Val Val
180 185 190
Leu Thr Leu Ala Ser Trp Ala Gln Leu Pro Leu Val His Val Gln Asp
195 200 205
Glu Ile Lys Lys Met Thr Phe Glu Ile Leu Val Lys Val Leu Met Ser
210 215 220
Thr Ser Pro Gly Glu Asp Met Asn Ile Leu Lys Leu Glu Phe Glu Glu

7/8

225 230 235 240

Phe Ile Lys Gly Leu Ile Cys Ile Pro Ile Lys Phe Pro Gly Thr Arg

245 250 255

Leu Tyr Lys Ser Leu Lys Ala Lys Glu Arg Leu Ile Lys Met Val Lys

260 265 270

Lys Val Val Glu Glu Arg Gln Val Ala Met Thr Thr Ser Pro Ala

275 280 285

Asn Asp Val Val Asp Val Leu Leu Arg Asp Gly Gly Asp Ser Glu Lys

290 295 300

Gln Ser Gln Pro Ser Asp Phe Val Ser Gly Lys Ile Val Glu Met Met

305 310 315 320

Ile Pro Gly Glu Glu Thr Met Pro Thr Ala Met Thr Leu Ala Val Lys

325 330 335

Phe Leu Ser Asp Asn Pro Val Ala Leu Ala Lys Leu Val Glu Glu Asn

340 345 350

Met Glu Met Lys Arg Arg Lys Leu Glu Leu Gly Glu Glu Tyr Lys Trp

355 360 365

Thr Asp Tyr Met Ser Leu Ser Phe Thr Gln Asn Val Ile Asn Glu Thr

370 375 380

Leu Arg Met Ala Asn Ile Ile Asn Gly Val Trp Arg Lys Ala Leu Lys

385 390 395 400

Asp Val Glu Ile Lys Gly Tyr Leu Ile Pro Lys Gly Trp Cys Val Leu

405 410 415

Ala Ser Phe Ile Ser Val His Met Asp Glu Asp Ile Tyr Asp Asn Pro

420 425 430

Tyr Gln Phe Asp Pro Trp Arg Trp Asp Arg Ile Asn Gly Ser Ala Asn

435 440 445

Ser Ser Ile Cys Phe Thr Pro Phe Gly Gly Gln Arg Leu Cys Pro

450 455 460

8/8

Gly Leu Glu Leu Ser Lys Leu Glu Ile Ser Ile Phe Leu His His Leu
465 470 475 480
Val Thr Arg Tyr Ser Trp Thr Ala Glu Glu Asp Glu Ile Val Ser Phe
485 490 495
Pro Thr Val Lys Met Lys Arg Arg Leu Pro Ile Arg Val Ala Thr Val
500 505 510
Asp Asp Ser Ala Ser Pro Ile Ser Leu Glu Asp His
515 520

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 5

gttaaaaacac taatggacac 20

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 6

tgatttatat tctttgatc c 21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02755

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N15/29, C12N15/09, C12N9/02, A01H1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N15/29, C12N15/09, C12N9/02, A01H1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JSTPLUS FILE (JOIS),
SwissProt/PIR/Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X Y | Database GenBank Accession No.AB066286, 20 July, 2001 (20.07.01), SHIMADA Y. et al., "Arabidopsis thaliana mRNA for CYP90D, complete cds." | 1, 3, 7, 12 8-11 |
| Y | KIM G. et al., Changes in the shapes of leaves and flowers upon overexpression of cytochrome P450 in Arabidopsis., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1999, Vol.96, pages 9433 to 9437 | 8-11 |
| A | KIM G. et al., The ROTUNDIFOLIA3 gene of Arabidopsis thaliana encodes a new member of the cytochrome P-450 family that is required for the regulated polar elongation of leaf cells., Genes & Development, 1998, Vol.12, pages 2381 to 2391 | 2-13 |

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

| | | |
|---|-----|--|
| * Special categories of cited documents: | "T" | later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "X" | document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date | "Y" | document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" | document member of the same patent family |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | | |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | |

Date of the actual completion of the international search
18 April, 2003 (18.04.03) Date of mailing of the international search report
06 May, 2003 (06.05.03)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

BEST AVAILABLE COPIE

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））
Int. Cl' C12N15/29, C12N15/09, C12N9/02, A01H1/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））
Int. Cl' C12N15/29, C12N15/09, C12N9/02, A01H1/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), JSTPLUSファイル(JOIS)
SwissProt/PIR/Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|----------------------------|
| X Y | Database GenBank Accession No. AB066286, 20 Jul 2001, SHIMADA Y. et al., "Arabidopsis thaliana mRNA for CYP90D, complete cds. | <u>1, 3, 7, 12</u> 8-11 |
| Y | KIM G. et al., Changes in the shapes of leaves and flowers upon overexpression of cytochrome P450 in Arabidopsis., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, Vol. 96, p. 9433-9437 | 8-11 |

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18. 04. 03

国際調査報告の発送日

06.05.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目 4番 3号

特許庁審査官（権限のある職員）

鈴木 恵理子

.4B

3037

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| A | KIM G. et al. The ROTUNDIFOLIA3 gene of <i>Arabidopsis thaliana</i> encodes a new member of the cytochrome P-450 family that is required for the regulated polar elongation of leaf cells., <i>Genes & Development</i> 1998, Vol. 12, p. 2381-2391 | 2-13 |